云 南 植 物 研 究 1998, 20 (3): 315~320
Acta Botanica Yunnanica

长喙毛茛泽泻（泽泻科）的交配系统研究*

汪小凡 陈家宽**
（武汉大学生命科学学院，武汉 430072）

摘要 对濒危植物长喙毛茛泽泻（*Ranalisma rostratum* Stapf.）的交配系统作了综合研究，结果是：该种的花粉粒和柱头较平滑，花内分泌细胞存在但欠发达，开花前花粉萌发率较高（71.6%）而开花 1 h 后花粉萌发能力急剧衰退，花粉/胚珠比较低（P/O = 106），花部综合特征与其花前期闭花授粉的交配习性相适应。该种的自然居群及实验居群中均未观察到花间的虫媒传粉，仅有极小型昆虫（蓟马科，Tripidae）起花内传粉作用，亦未检出风媒花粉流。人工隔离及控制授粉试验显示，该种在人工自交/异交后均有较高结实率，但自然状态下异交机制缺乏。用同工酶遗传标记法得到该种一个实验居群的交配系统特征参数异交率的估计值为 $\hat{\bar{t}} = 0.9\%$。

关键词 长喙毛茛泽泻，交配系统，异交率
分类号 Q 944

Studies on Mating System of *Ranalisma rostratum* (Alismataceae)

WANG Xiao-Fan CHEN Jia-Kuan
(*School of Life Sciences*, *Wuhan University*, Wuhan 430072)

Abstract The mating system of *Ranalisma rostratum* Stapf., an endangered aquatic species, was studied synthetically. The results are as follows: Pollen grains and stigmas were relatively smooth. Glandular cells occurred in flowers but not well developed. Pollen germination showed a higher level (71.6%) before flowering and a rapidly declining 1 hour after flower opening. Pollen-ovule ratio was a quite low value (P/O = 106). Floral syndromes were suitable to the mating habits of pre-anthesis cleistogamous. In natural or experimental populations, inter-flower pollination by insect were not observed, but intra-flower pollination were made by some small-sized insects (Tripidae). Pollen flow mediated by wind pollination was testified to be not existent. Results of artificial isolation or pollination showed that the fruit-sets after selfing/outcrossing were considerably high, but that outcrossing mechanism was short of in nature. Outcrossing rate of an experimental population was measured using isozyme genetic markers, the value estimated was, $\hat{\bar{t}} = 0.9\%$.

Key words *Ranalisma rostratum*, Mating system, Outcrossing rate

交配系统（mating system）包括某生物有机体中那些控制着配子如何结合以形成合子的所有属性。它作用于居群水平的基因传递而与有机体的进化直接相关（Clegg, 1980; Allard, 1975）。濒危过程是物种演化过

* 国家自然科学基金重大项目“中国主要濒危植物保护生物学研究”资助（项目编号 39391500）。
** 本论文负责和联系人。
1997-12-11 收稿，1998-03-05 接受发表

程中的一个特殊阶段，因而研究交配系统对探讨物种濒危及脱濒机制有着深刻的意义。

近年来，对长喙毛茛泽泻（*Ranalisma rostratum* Stapf.）濒危机制及保护生物学的研究已有一系列工作，包括生物学特性和种群生态学（陈中义等，1997）、繁殖生物学（田惠桥等，1995a, b；王建波等，1993）等方面的研究。对于该种高效的克隆繁殖（clonal reproduction）和花前期闭花授粉等习性及其可能造成的影响已有较为一致的认识。但该种开花后是否存在有效异花传粉以及是否为严格的专性自交（即异交率（outcrossing rate）为0或接近于0）尚属未知。本工作将对长喙毛茛泽泻的交配系统作系统的探讨，并对其特征参数作出定量估测。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试材料取自湖南茶陵居群（26°50′N，113°40′E）（汪小凡和陈家宽，1994）。1993年9月取样19株，分别植于武汉大学水生植物栽培区。部分研究以同科冠果草［*Sagittaria guayanensis* H. B. K. ssp. *lappula* (D. Don) Bogin］、矮慈姑（*S. pygmaea* Miq.）等种为对照。凭证标本存于武汉大学植物标本馆（WH）。

1.2 研究方法

1.2.1 花部综合特征研究　在野外或栽培实验区观察花部形态及开花过程。取FAA固定的花药经石蜡切片（厚2~3 μm）、番红染色观察花粉外壁结构。依开花前后不同时期取花粉作液体培养（2%蔗糖+0.01%硼酸中，约1×10^5粒/mL，25°C左右，2~3 h），统计萌发率。取FAA固定的雌蕊，经醋酸洋红染色、乳酸酚透明后观察柱头表面结构。用花药开裂前的花蕾，统计每花雄蕊数、每雄蕊花粉数、每花胚珠数，推算每花花粉量和花粉/胚珠比例（P/O比）。取FAA固定的花，经爱氏苏木精整体预染，常规石蜡切片（厚8 μm），PAS反应处理，观察花部分泌结构。

1.2.2 花粉流研究　虫媒花粉流以自然居群中昆虫访花频度及在花间飞行距离衡量。风媒花粉流观测用重力玻片法。

1.2.3 人工控制授粉试验　在栽培试验区中，对供试种的花作人工隔离和控制授粉处理：①整花套袋；②去雄蕊；③去雄蕊后套袋；④同源异花授粉；⑤异源异花授粉。各种操作皆在花药即将开裂时进行。统计各种处理的结实率，判定自交/异交的可能性与亲和性。

1.2.4 异交率的定量估测　自80年代以来，异交率定量研究常用多位点估计法（Shaw，1982；Shaw *et al*，1981；Ritland & Jain，1981），并有一系列统计软件用于此类工作（Ritland，1990）。但由于水生植物的克隆繁殖给选择标记位点带来困难（Berrett & Eckert，1993），本研究仍采用单位点估计法（Ennos & Clegg，1982；Clegg，1980；Jain，1979；Brown & Allard，1970）。①同工酶遗传标记选择：从供试材料各单株取鲜叶，分别加Tris-HCl提取液（王中仁，1996）制取酶样，用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法得到若干种同工酶酶谱，筛选明显而稳定的遗传多态位点作遗传标记。经反复比较、分析，确定酯酶（EST，E. C. 3. 1. 1. -）同工酶的一个位点为标记。考虑到EST位点可能在不同发育阶段表达不同，用2 mg鲜重幼苗至成株不同发育程度的叶制样作电泳分析，确认了所选标记位点的稳定性。②实验居群组建与取样：从2个不同纯合基因型的单株取克隆分株（remat），大致等量随机种植，待居群达到一定密度并进入花果期后，分别从已开花的克隆分株上取鲜叶30份以上，制取亲代酶样。被取样分株上已受粉的雌蕊群长成成熟聚合瘦果后培养出幼苗作为子代样本。③亲代基因型频率检测：对亲代酶样作电泳分析，根据EST酶谱，统计居群中亲本在标记位点上所表达的各基因型频率，并推算花粉库中雄配子体基因型频率。④子代杂合率检测：取两种纯合基因型亲本上的聚合果培养出的幼苗，分别制成子代酶样，检测每个家系子代在标记位点上的杂合率。共抽检9个家系，每家系抽检幼苗20~40株。⑤异交率估计：依Clegg（1980）等略作改动。设亲代中某一种纯合基因型频率为p，其子代杂合率为h，异交率t最大可能性估计值从下式得出：

$$t = h/(1-p)$$

2 结　果

2.1 花部综合特征

2.1.1 花部结构与开花习性　观察结果与文献报道（孙祥钟等，1991；Cook，1990）基本一致，但长喙毛茛泽泻雄蕊 5～10（多为 6～8），不以 9 枚者居多。其心皮数多达 70～150 枚，密集于头状花托上，是利于捕获花粉的结构。开花过程持续 1～2 d（昼开夜合）。萼刚张开略显露白色花瓣时，花药已开裂并散发花粉于雌蕊上，这种现象即花前期闭花授粉。由于花药小，而雌蕊甚多，开花前花粉在柱头上散布不匀。

2.1.2 花粉及其萌发　长喙毛茛泽泻花粉粒圆球形，直径 23.5（21.9～25.3）μm，外壁具颗粒状突起，较其近缘属慈姑属（*Sagittaria*）花粉的刺状外壁（王青锋等，1997；Argue，1974）平滑得多。该种开花前花粉粒在体外的萌发率高达 71.6%，开花 1 h 后花粉萌发能力急剧衰退；而矮慈姑的花粉萌发率在开花后 2 h 达到最高值（82.6%），开花后 4 h 仍维持在 25%左右（图 1）。

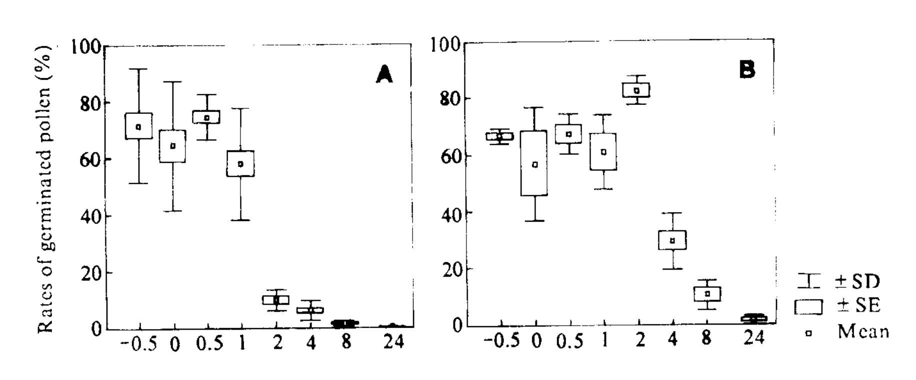


图 1　长喙毛茛泽泻（A）与矮慈姑（B）开花前后花粉萌发率的比较

Fig. 1　Comparison of pollen germination rates during flowering processes of *Ranalisma rostratum* Stapf.（A）and *Sagittaria pygmaea* Miq.（B）

2.1.3 花粉量与花粉－胚珠比（P/O 比）　见表 1。长喙毛茛泽泻花粉与胚珠之比（P/O 比）远低于矮慈姑（P/O = 2740），与同为花前期闭花授粉的冠果草（P/O = 123）较为接近，也与文献报道的自交类群 P/O 比相当（*周世良等，1997；Philbrick & Anderson，1987；Cruden，1977*）。*由于该种每雄蕊花粉量也明显少于慈*姑属的雌雄同株种，因此推测它已在资源配置上适应于其闭花授粉的传粉方式。

表 1　长喙毛茛泽泻的花粉量与花粉－胚珠比

Table 1　The pollen quantity and pollen－ovule ratio of *Ranalisma rostrtum*

		平均值 $\bar{x}$	标准差 *SD*	样本量 *N*
每花雄蕊数	No. of stamen per flower	7.0	1.0	15
每雄蕊花粉数	No. of pollen per stamen	1 440	290	105
每花花粉量	No. of pollen per flower	10 100	2 000	15
每花胚珠数	No. of ovule per flower	96	12	15
花粉－胚珠比	Pollen－ovule ratio, P/O	106	20	15

2.1.4 柱头表面结构　长喙毛茛泽泻柱头表面仅具颗粒状乳突，这种突起对附着花粉粒几乎不起作用。与此相比，慈姑属诸种的柱头乳突均为长达 100 μm 的单细胞指状突起。

2.1.5 花部分泌结构　长喙毛茛泽泻花内无明显的成形蜜腺，但存在腺细胞及分泌道，腺细胞位于最

外（最下）轮雌蕊基部，为一层方形、细胞质浓厚的大型细胞，它不如慈姑属大多数种类的同类结构发达。

2.2 传粉机制与花粉流

1993～1996年4年间对长喙毛茛泽泻自然居群和实验居群的观察未见有昆虫访花并在花间飞行。仅见一类小型昆虫（蓟马，*Tripidae*）在花内爬行。但王建波*认为，开花前2～3 h花粉管已进入胚囊，所以这些小型昆虫对传粉作用不大。

用重力玻片法在距花粉源0～5 m范围内未能收集到该种的花粉粒，证明无风媒传粉机制起作用。

根据对开花前柱头受粉情况的统计，柱头平均受粉率为51.4%（$SD=7.3\%$，$N=6$），柱头平均着粉数为1.0粒（$SD=1.2$粒，$N=29$）。说明该种虽为花前期闭花授粉，但要保证较高的结实率，开花后传粉过程依然存在，只不过花粉扩散过程可能仅限于花内。

2.3 人工控制授粉结实情况

在栽培条件下对长喙毛茛泽泻作了人工控制授粉的各种处理，结实率见表2。去雄并套袋后结实率极低，基本上可排除无融合结籽的可能性；整花套袋后与自然状态结实率（95%左右）相当，表明该种自交可育且不依赖于虫媒或风媒传粉；人工异株授粉结实率可达50%以上，但与整花套袋的结实率差异极显著（$t=6.26$，d.f.$=28$，$P<0.01$）；由于人工同株授粉与异株授粉结实率并无显著差异（$t=0.55$，d.f.$=14$，$P>0.5$），而同样与整花套袋时差异极显著（$t=7.09$，d.f.$=22$，$P<0.01$），因而人工授粉结实率偏低可以看作是操作过程造成的，但应肯定，该种在人工自交、异交后均可育；去雄（不套袋）时几乎不结实，表明该种在自然状态下缺少有效异花传粉机制。

表2 长喙毛茛泽泻在人工隔离和控制授粉条件下的结实率

Table 2 The percent fruit-sets of *Ranalisma rostratum* after artificial isolation or pollination

处理 Treatments	平均值 $\bar{x}$ (%)	标准差 SD (%)	样本量 N
去雄+套袋 Emasculation and sheathing	3.6	6.0	14
整花套袋 Sheathing before bloming	97.7	6.1	19
同株异花授粉 Hand pollination between flowers of same plant	44.0	33.0	5
异株异花授粉 Hand pollination between flowers of different plant	53.2	30.4	11
去雄，不套袋 Emasculation, no sheathing	2.1	4.6	12

2.4 交配系统特征参数——异交率

2.4.1 实验居群基本状况 种源为湖南茶陵居群，所取回长喙毛茛泽泻19个单株中仅1株在EST酶谱上与其他单株有明显而稳定的差异，实验居群即由此株的克隆分株与另一植株的克隆分株共同构建而成，位于武汉大学校园内。在适当水位等条件下，该居群以克隆繁殖迅速增长。盛花期（7～8月）时花序密度达70枝/m^2，取样时（9月初）花序密度为50枝/m^2。

2.4.2 遗传标记及亲本基因型频率 用PAGE法对多种同工酶作过分析，确定以EST同工酶的Est-3位点为遗传标记，该位点在各个发育期均十分稳定。在本研究所用标准电泳条件[分离胶浓度10%、a∶b=37.5、pH=8.8，胶板规格120 mm（长）×104 mm（宽）×1 mm（厚）；浓缩胶浓度4%、a∶b=37.5、pH=6.8；电极液为Tris-甘氨酸缓冲液pH=8.3；稳压250 V，电泳时间约3.5 h]下，其迁移率为Rf=0.43～0.46，表达了2个等位基因：E_3^a（Rf=0.43）、E_3^b（Rf=0.46）。长喙毛茛泽泻亲代（孢子体）EST同工酶谱带如图2。经检测，实验居群中Est-3位点上表达的基因型频率为，$E_3^aE_3^a$：0.500，$E_3^bE_3^b$：0.500。

---

* 王建波，1996．濒危植物长喙毛茛泽泻的保护生物学研究：生活史特征及濒危机理研究．武汉：武汉大学博士学位论文

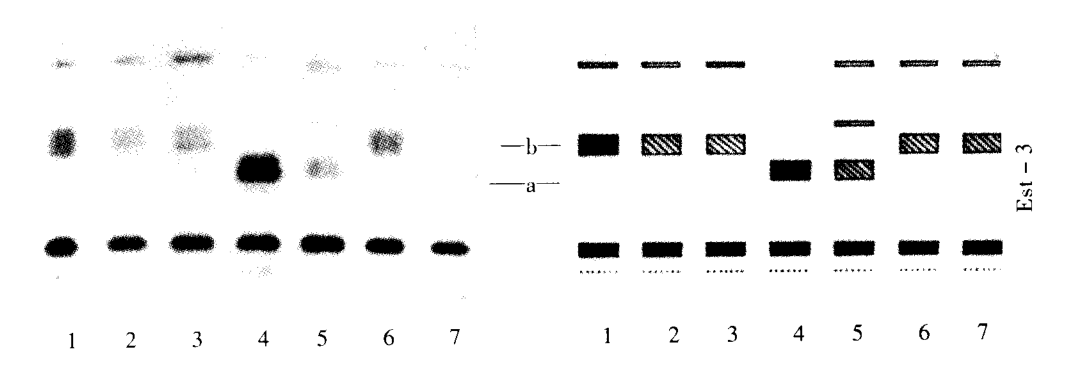


图 2　长喙毛茛泽泻酯酶同工酶谱带，示异交率定量估测所用遗传标记（Est－3 位点）

Fig. 2　EST bands of *Ranalisma rostratum* Stapf., showing a genetic marker (locus Est－3) used to estimate the outcrossing rate

2.4.2　子代杂合率与异交率估计值　　按上述电泳条件检测了 9 个家系的子代，只在 1 个家系中检出 1 株杂合型子代，该家系子代杂合率为 4.0%，其余 8 个家系子代杂合率均为 0。推算出各个家系异交率最大可能性估计值，其平均值为，$\bar{t}$ = 0.9%（ SD = 2.7%，N = 9）。根据异交率定量估计结果，长喙毛茛泽泻的交配系统应为专性自交系统。

3　讨　论

3.1　花部综合特征与传粉机制的关系

花部特征与传粉机制应是相适应的。Cook（1988）曾提出适应风媒传粉的综合特征。长喙毛茛泽泻花粉粒较小且平滑、具聚合的多心皮（增加了接受花粉粒的面积）是适应风媒传粉的特征，但其花序位置低、柱头较平滑、P/O 比小，不能适应风媒传粉。该种花冠明显、花内有腺细胞是适应虫媒传粉的特征，但花粉粒过于平滑、花内分泌结构欠发达，不利于虫媒传粉。可见，长喙毛茛泽泻的花部结构无明显的风媒传粉/虫媒传粉的倾向。根据风媒/虫媒传粉机制均不发达、P/O 比甚小、开花后花粉萌发能力衰退较快、开花前花药已开裂等，可以推测，长喙毛茛泽泻的花部综合特征适应于自花传粉。

3.2　长喙毛茛泽泻交配系统的演化与适应性

Stebbins（1957）指出，异体受精无疑是较原始的遗传机制，它是造成较大灵活性的，而自体受精类型在植物界各门各纲内多次独立产生过，大概是对有利于即时性适合度的选择压力所起的反应。长喙毛茛泽泻的自交机制可能是由水位变化形成的选择力所塑造的，该种为矮小的沼生植物，通常挺水开花而后结实，花前期闭花传粉能使成熟花蕾在淹水时借助花被围成的气室在水下完成自花传粉。这类似于眼子菜属（*Potamogeton*）中某些种的水下气泡中传粉*。依 Philbrick（1988）关于从空中传粉系统向水下异花传粉演化的假说，水下气泡中传粉为一种中间过渡状态。由此推测，长喙毛茛泽泻的祖先为挺水类型，有向适应沉水生活演进的趋势，因为逆向演化无须此过渡状态。

闭花受精虽然能保证产生大量种子，但在遗传学上带来的效应就是大多数基因位点上的纯合。自交与营养繁殖构成的专性自体繁育系统会使该种遗传杂合性水平大为降低。尽管根据作者之一的研究，AP－PCR 分析的结果表明长喙毛茛泽泻的遗传多样性水平要比预期的高，但本研究中发现在同工酶水平上该种

* Guo Y H, 1990. Studies on the Floral biology of some Genera of Potamogetonaceae sensu lato. Ph D Thesis, Wuhan: Wuhan Univ.

的多态位点百分率和杂合度均仅有较低的水平，以致于寻找一个能作为遗传标记的多态位点都十分困难。进化性变异不单使生命能忍受由环境所发生的震动，同时还能使生命能够不断征服新的生存场所，并对老的生存场所逐步地建立起更加巩固的控制（Dobzhansky，1953）。遗传基础杂合的居群通常具有适应变动生境的能力。虽然 Allard（1975）认为自交居群中仍保留有相当可观的重组潜力和相当活跃的遗传可变性，而这在长时期中对自然选择的应答是有价值的，但还应考虑到，自交居群在对变动生境的快速反应方面远不及异交居群。由于长喙毛茛泽泻所处的湿地生境是极其易变的。自交和营养繁殖导致的遗传多样性水平偏低必然地对其居群适应生境的能力有不利的影响。

参 考 文 献

王中仁，1996. 植物等位酶分析. 北京：科学出版社，77 ~ 119

王青锋，张志耘，陈家宽，1997. 泽泻科的花粉形态研究. 植物分类学报，**35**：225 ~ 235

王建波，汪小凡，陈家宽等，1993. 长喙毛茛泽泻繁殖特性的初步研究. 武汉大学学报（自然科学版），**39**：130 ~ 132

田惠桥，陈家宽，郭友好，1995a. 濒危植物——长喙毛茛泽泻的雌雄配子体发育. 植物分类学报，**33**：221 ~ 224

田惠桥，陈家宽，郭友好，1995b. 濒危植物——长喙毛茛泽泻的受精作用及胚胎和胚乳的发育. 植物分类学报，**33**：357 ~ 361

孙祥钟编辑，1991. 中国植物志 第八卷. 北京：科学出版社，127 ~ 145

汪小凡，陈家宽，1994. 湖南境内珍稀、濒危水生植物产地的考察. 生物多样性，**2**：193 ~ 198

陈中义，何国庆，陈家宽，1997. 濒危植物长喙毛茛泽泻生物学特性观察. 武汉大学学报（自然科学版），**43**：201 ~ 204

周世良，潘开玉，洪德元，1996. 杭州石荠苎和石香薷（唇形科）传粉生物学比较研究. 植物学报，**38**：530 ~ 540

Allard R W, 1975. The mating system and microevolution. *Genetics* , **79**: 115 ~ 126

Argue C L, 1974. Pollen studies in the Alismataceae (Alismaceae). *Bot Gaz* , **135**: 338 ~ 344

Berrett S C H, Eckert C G, Husband B C, 1993. Evolution processes in aquatic plant population. *Aquat Bot* , **44**: 105 ~ 145

Brown A H D, Allard R W, 1970. Estimation of mating system in open - pollinated maize population using isozyme polymorphisms. *Genetics* , **66**: 133 ~ 145

Clegg M T, 1980. Measuring plant mating systems. *BioScience* , **30**: 814 ~ 818

Cook C D K, 1988. Wind pollination in aquatic angiosperms. *Ann Miss Bot Gard* , **75**: 768 ~ 777

Cook C D K, 1993. 世界水生植物. 王徽勤等译. 武汉：武汉大学出版社，35 ~ 41

Cruden R W 1977. Pollen - ovule ratios: A conservative indicator of breeding sysrems in flowering plants. *Evolution* , **31**: 32 ~ 46

Dobzhansky T, 1964. 遗传学与物种起源. 谈家桢等译. 北京：科学出版社，1 ~ 15

Ennos R A, Clegg M T, 1982. Effect of population substructuring on estimates of outcrossing rate in plant populations. *Heredity* , **48**: 283 ~ 292

Jain S K, 1979. Estimation of outcrossing rates: Some alternative procedures. *Crop Sci* , **19**: 23 ~ 26

Philbrick C T, 1988. Evolution of underwater outcrossing from aerial pollination systems: a hypothesis. *Ann Miss Bot Gard* , **75**: 836 ~ 841

Philbrick C T, Anderson G J, 1987. Implications of pollen/ovule ratios and pollen size for the reproductive biology of Potamogeton and autogamy in aquatic angiosperms. *Syst Bot* , **12**: 98 ~ 105

Ritland K, 1990. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. *J Hered* , **81**: 235 ~ 237

Ritland K, Jain S, 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* , **47**: 35

Shaw D V, Kahler A L, Allard R W, 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. *Proc Natl Acad Sci USA* , **78**: 1292 ~ 1302

Shaw D V, 1982. Optimum number of marker loci for estimating outcrossing in plant population. *Theor Appl Genet* , **61**: 321 ~ 325

Stebbins G L, 1963. 植物的变异和进化. 复旦大学遗传学研究所译. 上海：上海科学技术出版社，122 ~ 150